

УДК 577.33

Индукция фототоксичности флавопротеида miniSOG посредством биолюминесцентного резонансного переноса энергии

Е. И. Шрамова^{1*}, Г. М. Прошкина^{1*}, С. П. Чумаков¹, Ю. М. Ходарович¹, С. М. Деев^{1,2}¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10²Национальный исследовательский Томский политехнический университет, 634050, Томск, просп. Ленина, 30

*E-mail: shramova.e.i@gmail.com, gmb@ibch.ru

Поступила в редакцию 08.07.2016

Принята в печать 11.10.2016

РЕФЕРАТ Изучена возможность возбуждения фототоксичного флавопротеида miniSOG (фотосенсибилизатора) в раковых клетках в результате биолюминесценции, вызванной окислением субстрата фуримазина люциферазой NanoLuc, и оценена индуцированная фототоксичность *in vitro*. Показано, что в присутствии субстрата фуримазина люцифераза NanoLuc, введенная в составе генетической конструкции, содержащей miniSOG, в эукариотические клетки, вызывает возбуждение фототоксичного флавопротеида miniSOG. При этом miniSOG проявляет фотоиндуцированную цитотоксичность, и смертность клеток в стабильно трансфицированной линии составляет 48%.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биолюминесцентный резонансный перенос энергии, люцифераза NanoLuc, флавопротеид miniSOG, фотодинамическая терапия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АФК – активные формы кислорода; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ФДТ – фотодинамическая терапия; ФМН – флавиномононуклеотид; ВРЕТ – биолюминесцентный резонансный перенос энергии (bioluminescence resonance energy transfer).

ВВЕДЕНИЕ

Свойства света как терапевтического агента используются человечеством более 3000 лет [1]. За точку отсчета современного подхода к изучению явления фотосенсибилизации принято считать работу Оскара Рааба, опубликованную в 1900 г. [2]. Рааб установил, что сочетание света и определенных химических веществ индуцирует гибель живых клеток: в солнечный день краситель акридиновый оранжевый вызывал гибель инфузорий, а в пасмурный день – нет [2]. Именно с установления этого факта начинается современная фотодинамическая терапия (ФДТ).

Фотодинамическая терапия в современном виде представляет собой трехкомпонентную систему, состоящую из фотосенсибилизатора, света определенной длины волны и молекулярного кислорода. Эти три ключевых компонента, нетоксичные каждый по отдельности, соединяясь вместе, продуцируют активные формы кислорода (АФК) и тем самым индуцируют кислородзависимую гибель клеток.

ФДТ – перспективный метод терапии злокачественных образований человека, поскольку позволяет воздействовать на опухоль селективно и локально.

В силу того, что для фотодинамической терапии необходим внешний источник света, в клинической практике этот метод используется только в терапии опухолей кожи и сетчатки, а также эпителиальных поверхностей органов, доступных для катетеров и эндоскопов. Так, в настоящее время применение ФДТ одобрено при карциномах головы и шеи [3], рака легкого [4], верхних отделов пищеварительного тракта [5], а также злокачественных новообразований [6].

Главная проблема фотодинамической терапии сопряжена с потерей оптической активности (интенсивности) возбуждающего света в результате рефракции, отражения, поглощения и рассеяния квантов света в биологических тканях. Благодаря способности тканей поглощать и рассеивать свет проникающая способность видимого света в тканях составляет не более 10 мм. Кроме того, поглощение излучения определяется биологическими хромофорами ткани:

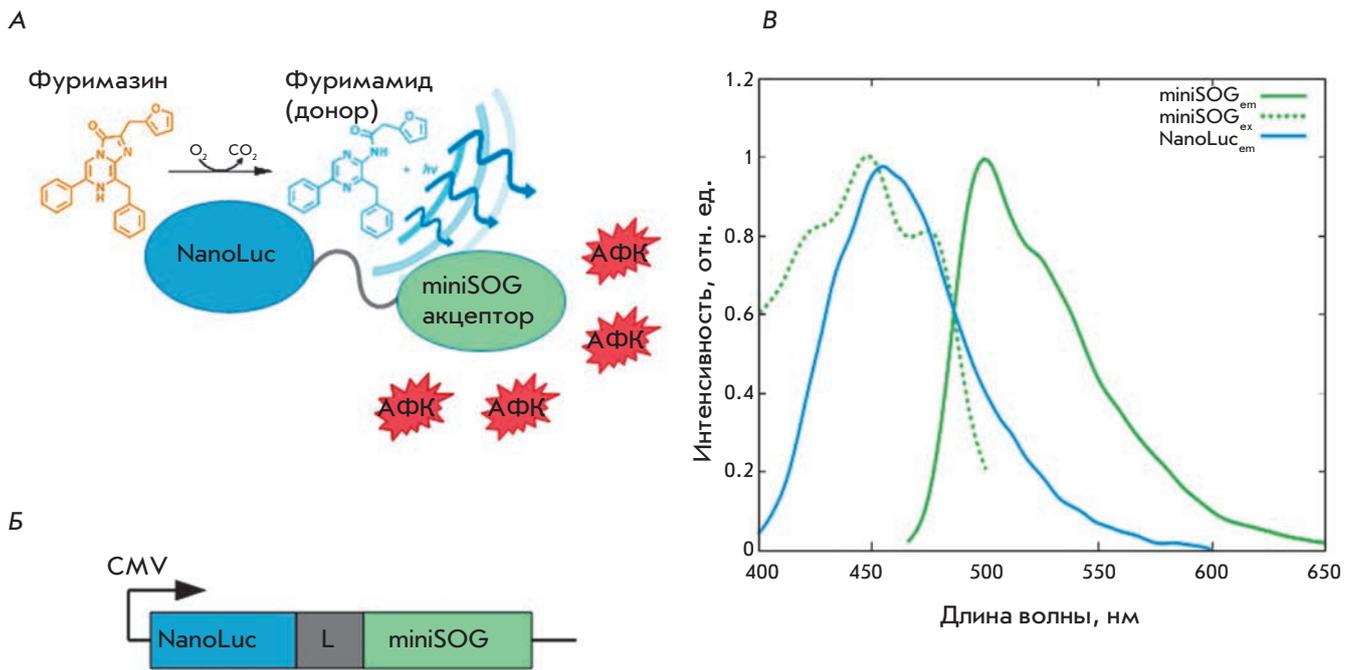


Рис. 1. Принцип работы системы «люцифераза–фуримазин–miniSOG». **А** – принцип биолюминесцентного резонансного переноса энергии. **Б** – схема конструкции, содержащей в одной рамке считывания ген люциферазы NanoLuc, пептидный линкер GGGGS (L) и цитотоксический модуль miniSOG под контролем CMV-промотора. **В** – нормированные спектры испускания фуримамида (NanoLuc_{em}), спектры возбуждения (miniSOG_{ex}) и флуоресценции (miniSOG_{em}) miniSOG

в ультрафиолетовой области спектра целевыми хромофорами являются почти все белки, от 400 до 600 нм поглощают оксигемоглобин, дезоксигемоглобин и меланин, от 1200 до 2000 нм – вода. Таким образом, «окно прозрачности» биологических тканей для ФДТ находится в диапазоне 650–1200 нм [7].

С началом процесса метастазирования становится трудным или невозможным доставить свет непосредственно ко всем очагам опухолевого роста. Если создать внутренние источники излучения, то свет можно доставить к любому участку тела на любую глубину, что могло бы значительно расширить область применения фотодинамической терапии [8].

В современной молекулярной и клеточной биологии для изучения внутриклеточных процессов *in vivo* и *in vitro*, а также для биоимиджинга широко используется явление биолюминесцентного резонансного переноса энергии, BRET (Bioluminescence resonance energy transfer) [9–11], в основе которого лежит Фёрстеровский резонансный перенос энергии между двумя хромофорами. При этом донором служит субстрат люциферазы, который при окислении в присутствии кислорода испускает фотоны в видимой области спектра, а акцептором – флуоресцентный белок (рис. 1А).

С помощью генно-терапевтических подходов ген, кодирующий люциферазу, можно селективно экспрессировать в раковых клетках с использованием опухолеспецифичных промоторов [12, 13] либо селективно доставлять его к опухолевым клеткам с применением таких носителей, как псевдотипированные вирусные конструкции [14], адресные полиэтилениминные комплексы и т.д. [15]. Таким образом, использование биолюминесценции в качестве внутриклеточного источника излучения для возбуждения фотосенсибилизатора в раковой клетке может стать решением проблемы доставки света вглубь тканей.

Возможность применения этого явления в терапии была впервые показана в 1994 г. [16]: фотосенсибилизатор гиперидин, возбуждаемый биолюминесценцией люциферина, приводил к инактивации вируса анемии лошадей *in vitro*.

Однако возможность использования BRET для фотодинамической терапии рака показали только в 2003 г. [17]. Фотосенсибилизатор бенгальский красный, находясь в цитозоле в присутствии люциферина, вызывал гибель 90% популяции фибробластов NIH 3T3 мыши, стабильно экспрессирующих ген люциферазы.

Согласно [18], люминесцентная молекула люминол также может использоваться в качестве внутриклеточного источника света для возбуждения фотосенсибилизатора. Жизнеспособность клеток HeLa, подвергнутых обработке люминолом в присутствии фотосенсибилизатора, составляла менее 10%. Проведение противоопухолевой терапии *in vivo* привело к снижению роста опухоли у мышей опытной группы на 55% по сравнению с контрольной. При этом люминол и фотосенсибилизатор вводили непосредственно в опухоль опытных животных.

В 2015 г. была показана возможность BRET-опосредованной фотодинамической терапии глубоких опухолей и метастазов на мышинной модели [19]. В этой работе в качестве внутриклеточного источника для фотодинамической терапии использовали квантовые точки, покрытые люциферазой. В присутствии субстрата люциферазы квантовые точки возбуждали фотосенсибилизатор хлорин е6, приводя к регрессии первичного опухолевого очага и метастазов в лимфоузлах.

Отметим, что во всех рассмотренных работах использованы химические фотосенсибилизаторы, которые вводили в организм интратуморально или системно.

Ранее в нашей лаборатории на основе фототоксичного флавопротеида miniSOG были получены адресные генетически кодируемые белковые фотосенсибилизаторы, обладающие высокой цитотоксической активностью *in vitro* в отношении HER2-положительных клеток аденокарциномы молочной железы [20–23]. Возбуждение miniSOG происходит в синей области спектра ($\lambda_{\max} = 448$ нм) [24], что накладывает ряд ограничений на использование данных фотосенсибилизаторов *in vivo*.

Для решения проблемы доставки синего света *in vivo* мы предлагаем систему, в которой фотосенсибилизатор miniSOG возбуждается в ходе реакции окисления субстрата (фуримазина) люциферазой NanoLuc (Promega). Мы показали, что люцифераза NanoLuc, экспрессируемая в эукариотических клетках в составе единой генетической конструкции с miniSOG, в присутствии субстрата фуримазина вызывает возбуждение фототоксичного флавопротеида miniSOG. При этом miniSOG проявляет фотоиндуцированную цитотоксичность и вызывает гибель 48% трансфицированных клеток.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культуры эукариотических клеток

В работе использовали клетки аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3. Клетки растили в средах McCoys 5A (HyClone, Бельгия) или RPMI

1640 без фенолового красного (Gibco, Германия), содержащих 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone, Бельгия) и антибиотика (пенициллин 50 ед/мл, стрептомицин 50 мкг/мл, «ПанЭко», Россия), при 37°C в атмосфере 5% CO₂ и повышенной влажности. При культивировании клеток, экспрессирующих miniSOG, в качестве источника кофактора ФМН в среду добавляли рибофлавин («Фармстандарт-УфаВита», Россия) до конечной концентрации 150 мкМ.

Получение конструкции NanoLuc–miniSOG

Кодирующую последовательность гена фотоактивируемого цитотоксичного белка miniSOG клонировали в плазмиду pNL1.1.CMV (Promega), содержащую ген люциферазы NanoLuc под контролем CMV-промотора, используя стандартные методы генной инженерии. Кодирующую последовательность гена miniSOG амплифицировали с плазмиды pDAR-miniSOG [22] с использованием специфических праймеров oGP13 (5'-GCGGGTGGCGGAGGGAGCATGGAAAAGAGCTTTGTGATTACC-3', подчеркнута линкерная последовательность) и oGP14 (5'-GGTCTAGAATTAGCCATCCAGCTGC-3', подчеркнут сайт эндонуклеазы XbaI). Кодирующую область гена люциферазы NanoLuc амплифицировали с использованием специфических праймеров oGP11 (5'-CAGTTTGTTCAGAAATCTCGGGG-3', подчеркнут сайт эндонуклеазы AvaI) и oGP12 (5'-CCATGCTCCCTCCGCCACCCGCCAGATGCGTTCGCACAG-3', подчеркнута линкерная последовательность). Подчеркнутая в структуре праймеров последовательность кодирует пептидный линкер GGGGS, предусмотренный для того, чтобы два функциональных домена (люцифераза NanoLuc и фототоксин miniSOG), входящие в состав гибридного белка, не испытывали стерических затруднений в пространстве и сохраняли свои функциональные свойства. ПЦР-продукты, кодирующие NanoLuc и miniSOG, объединяли в эквимольном соотношении, нагревали до 90°C и медленно понижали температуру до 24°C с тем, чтобы комплементарные участки линкерной последовательности могли взаимодействовать друг с другом. После этого проводили ПЦР с использованием праймеров oGP11 и oGP14 для получения полноразмерной гибридной конструкции NanoLuc–miniSOG. Полученный фрагмент обрабатывали эндонуклеазами рестрикции AvaI и XbaI и клонировали в вектор pNL1.1.CMV, расщепленный этими же рестриктазами. В результате была получена плаزمиды pNanoLuc–miniSOG, содержащая в одной рамке считывания кодирующие последовательности генов NanoLuc и miniSOG, соединенные линкерным участком, под контролем конститутивно-

го промотора CMV. Правильность конструкции подтверждали секвенированием. Схема генетической конструкции представлена на *рис. 1Б*.

Получение плазмиды pNanoLuc-miniSOG-puro

Для получения клеточных линий, стабильно экспрессирующих гибридный ген *NanoLuc-mSOG*, в плазмиду NanoLuc-miniSOG был введен ген устойчивости к пурамицину. Этот ген, включая промотор NP гена *p53* человека и сигнал полиаденилирования, амплифицировали с плазмиды pLCMV-puro (любезно предоставлена П.М. Чумаковым) с использованием специфических праймеров 5'-AAGGAAAAAAGC-GGCCGCTGTGAAGGAAGCCAACCA-3' (подчеркнут сайт эндонуклеазы NotI) и 5'-AAAАСТGСА-CTTCCGGCTCGTATGTTGTGT-3' (подчеркнут сайт эндонуклеазы PstI). Полученный фрагмент обрабатывали эндонуклеазами рестрикции PstI и NotI и лигировали с плазмидой pNanoLuc-mSOG, предварительно обработанной этими же рестриктазами.

Трансфекция клеток SK-BR-3

Для проведения трансфекций использовали плазмидную ДНК, выделенную из бактериальных клеток с помощью набора PureLink™ (Invitrogen), согласно инструкции производителя. Трансфекцию проводили с помощью реагента FuGENE® HD (Promega) согласно рекомендациям производителя (<http://www.promega.com/techserv/tools/FugeneHdTool/>). За 1 сут до трансфекции клетки рассеивали с плотностью 10^5 клеток/мл в полной ростовой среде без антибиотиков. Использовали FuGENE® HD и ДНК в соотношении 3 : 1, при этом концентрация плазмидной ДНК при образовании комплексов составляла 0.02 мкг/мкл. Объем добавляемой к клеткам среды, содержащей комплексы FuGENE® HD и ДНК, составлял 1/20 общего объема ростовой среды. Комплексы готовили в среде, не содержащей сыворотку и антибиотики, культивировали при комнатной температуре в течение 5–10 мин и добавляли к клеткам. При работе с плазмидами, содержащими *miniSOG*, через 6 ч после трансфекции к клеткам добавляли рибофлавин (кофактор ФМН). Оптимальные условия трансфекции определяли в предварительных опытах, оценивая флуоресценцию *miniSOG* через 24–48 ч после трансфекции с помощью флуоресцентного микроскопа.

Отбор трансфицированных клеток

Клетки, экспрессирующие NanoLuc-miniSOG, отбирали спустя 48 ч после трансфекции с помощью сортера BD FACS Vantage (BD, США). Для отбора выделяли область ярко светящихся клеток на диаграмме FL1-FL2 так, чтобы она не захватывала клетки,

флуоресцирующие из-за присутствия в среде ФМН (фоновая флуоресценция ФМН). Отобранные клетки рассеивали с плотностью 10^5 клеток/мл на лунки 96-луночного планшета в 100 мкл полной ростовой среде, содержащей пенициллин (50 ед/мл), стрептомицин (50 мкг/мл), канамицин (100 мкг/мл) и гентамицин (10 мкг/мл) (все антибиотики производства фирмы «ПанЭко», Россия).

Получение стабильных клеточных линий

Концентрация пурамицина (Sigma, США), вызывающая гибель 100% клеток в течение 14 дней, – 0.25 мкг/мл для клеток SK-BR-3, была подобрана в предварительных опытах. Через 48 ч после трансфекции плазмидой pNanoLuc-miniSOG-puro среду в планшетах с культивируемыми клетками заменяли свежей, добавляя ФМН и пурамицин. Клоны стабильно трансфицированных клеток сформировались к 14–15 дню, после чего клетки пассировали в присутствии пурамицина в течение 3 мес.

Детекция люминесценции люциферазы NanoLuc

Люминесценцию люциферазы NanoLuc и гибридного белка NanoLuc-miniSOG оценивали спустя 48–72 ч после проведения трансфекции на приборе Infinite M1000 Pro (Tecan, Швейцария). Измерения проводили на живых клетках в полной среде RPMI, не содержащей фенолового красного, в 96-луночных планшетах с черными стенками (для каждой точки выполняли по три повтора). Субстрат люциферазы фуримазин (Promega) в концентрации 30, 43 и 75 мкМ добавляли в режиме инъекции на приборе Infinite M1000 Pro (Tecan, Швейцария). Задержка после инъекции до момента анализа составляла 10 с. Для каждой опытной точки снимали спектры люминесценции в диапазоне длин волн от 400 до 600 нм с шагом 4 нм и временем детекции 100 мс. Полученные данные обрабатывали с помощью программы OpenOffice, версия 4.1.2. Для построения графиков спектров применяли математическую обработку данных (сглаживание кубическими сплайнами).

Оценка цитотоксического действия NanoLuc-miniSOG *in vitro*

Цитотоксичность NanoLuc-miniSOG в присутствии фуримазина определяли с помощью МТТ-теста [25]. Клетки SK-BR-3, стабильно экспрессирующие ген *NanoLuc-miniSOG*, в количестве 10^5 клеток/мл среды рассеивали в 96-луночный планшет в объеме 200 мкл суспензии на лунку и культивировали в течение ночи. Затем к клеткам добавляли фуримазин и инкубировали в течение 48 ч. Среду удаляли, в лунки вносили по 100 мкл раствора бромид

3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ, «ПанЭко») (0.5 мг/мл), приготовленного на среде McCoу's 5А, и инкубировали в течение 1 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. После этого раствор МТТ удаляли, к содержимому лунок добавляли по 100 мкл ДМСО, планшет встряхивали на шейкере до полного растворения кристаллов формазана. Оптическое поглощение содержимого каждой лунки измеряли на планшетном спектрофотометре Infinite M1000 (Tecan, Швейцария) на двух длинах волн: 570 (рабочая) и 650 нм (сравнение). Эксперименты выполняли в трех повторах. Выживание клеток после инкубации с фуримазином оценивали по количеству формазана, образовавшегося в результате восстановления клетками раствора МТТ и растворенного в диметилсульфоксиде (количество формазана пропорционально числу живых клеток). Данные обрабатывали с помощью программы OpenOffice, версия 4.1.2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для эффективного прямого переноса энергии от окисленной формы субстрата к акцептору (Фёрстеровский резонансный перенос энергии) требуется выполнение ряда условий. Во-первых, спектр испускания донора должен максимально совпадать со спектром возбуждения акцептора. Во-вторых, донор и акцептор должны находиться друг от друга на расстоянии, не превышающем 10 нм [26].

Проведя анализ опубликованных данных, мы обнаружили, что в результате реакции окисления фуримазина люциферазой NanoLuc глубоководной креветки *Oplophorus gracilirostris* происходит выделение света в видимой области спектра с максимумом испускания при 460 нм [27]. Максимум поглощения фототоксичного флавопротеида miniSOG составляет 448 нм [24]. Таким образом, окисленная форма фуримазина (фуримамид) и miniSOG представляют собой хорошую пару донор–акцептор для биолюминесцентного резонансного переноса энергии. Наложение спектров испускания фуримазида и возбуждения miniSOG представлено на рис. 1В.

Чтобы сблизить в пространстве донор и акцептор, мы получили конструкцию, в которой в одной рамке считывания под контролем конститутивного CMV-промотора находились гены люциферазы NanoLuc и фототоксина miniSOG, соединенные коротким линкером из 15 нуклеотидов (рис. 1В).

Эффективность работы данной системы *in vitro* оценили, используя трансфекцию клеток линии SK-BR-3 полученной конструкцией. Анализ спектров испускания трансфицированных клеток в присутствии фуримазина показал наличие пика при 460 нм, соответствующего максимуму испускания окисленной формы фуримазина (рис. 2).

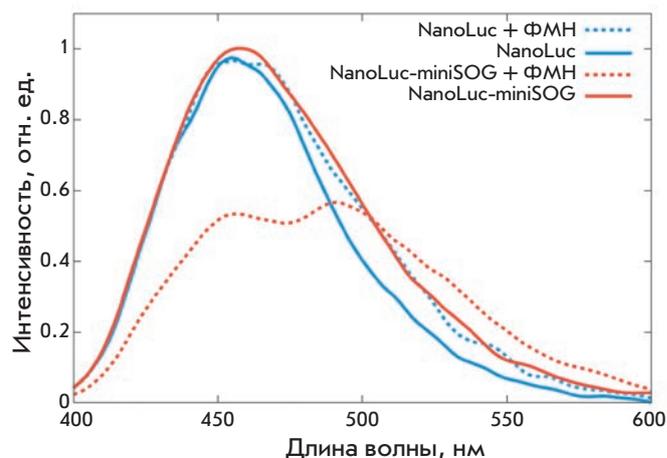


Рис. 2. Спектры испускания биолюминесцентных систем NanoLuc–фуримазин (на графике обозначена NanoLuc) и NanoLuc–фуримазин–miniSOG (обозначена NanoLuc-miniSOG) в зависимости от кофактора ФМН

Известно, что кофактором всех фототропинов (и флавопротеида miniSOG в том числе) является ФМН. Фототоксичность miniSOG прямо зависит от его насыщенности кофактором: под действием кванта синего света ФМН переходит в возбужденное состояние, и вся энергия возбужденного состояния ФМН идет на генерацию активных форм кислорода [24]. Поэтому к клеткам, трансфицированным плазмидой pNanoLuc-miniSOG, добавляли рибофлавин в концентрации 150 мкМ, который, проникая через клеточную мембрану, превращается в ФМН в результате фосфорилирования рибофлавин-киназой. Добавление рибофлавина к клеткам, трансфицированным pNanoLuc-miniSOG, в присутствии фуримазина приводило к уменьшению интенсивности пика при 460 нм и к появлению пика при 500 нм (максимум испускания miniSOG), что свидетельствует о переносе энергии от фуримазида к miniSOG. Отметим, что добавление ФМН к клеткам, трансфицированным плазмидой с геном люциферазы NanoLuc (без miniSOG), не приводит к появлению пика при 500 нм (рис. 2).

Для оценки цитотоксического эффекта, вызываемого системой NanoLuc–фуримазин–miniSOG, клетки SK-BR-3, трансфицированные плазмидой pNanoLuc-miniSOG, через 48 ч после трансфекции отбирали с помощью сортера BD FACS Vantage (BD). Отобранные клетки высевали на 96-луночный планшет для оценки цитотоксичности конструкции NanoLuc-miniSOG в присутствии фуримазина. Однако клетки, пропущенные через сортер и, таким образом, подвергнутые облучению лазером с длиной

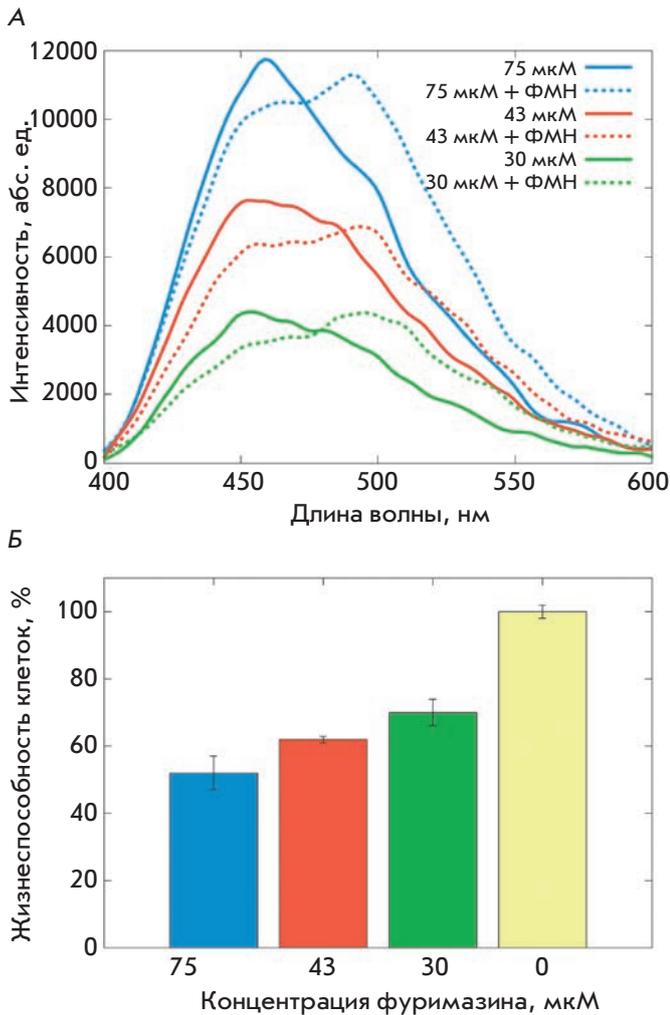


Рис. 3. Функциональная характеристика биолюминесцентной системы NanoLuc–фуримазин–miniSOG. **А** – изменение профиля спектров испускания гибридного белка NanoLuc–miniSOG в зависимости от концентрации фуримазина и наличия ФМН. **Б** – зависимость цитотоксического действия гибридного белка NanoLuc–miniSOG от концентрации фуримазина

волны 473 нм, оказались нежизнеспособными. Мы полагаем, что короткого времени экспозиции синим светом (пролет клетки через луч лазера) было достаточно для возбуждения miniSOG и проявлению его фотоиндуцируемой цитотоксичности.

Чтобы обойти эту проблему, мы получили клеточную линию SK-BR-3, стабильно экспрессирующую конструкцию NanoLuc–miniSOG. Отбор трансфектантов проводили в присутствии антибиотика пурамицина как описано в разделе «Экспериментальная часть».

Анализ спектров испускания клеток, содержащих гибридный белок NanoLuc–miniSOG, в присутствии различных концентраций фуримазина выявил пик при 460 нм, интенсивность которого коррелирует с концентрацией субстрата (рис. 3А). Добавление ФМН к клеткам приводит к появлению пика при 500 нм, характерного для максимума испускания miniSOG (рис. 3А).

Для изучения цитотоксического действия системы «люцифераза NanoLuc–фуримазин–фототоксин miniSOG» клетки SK-BR-3, стабильно экспрессирующие гибридную конструкцию NanoLuc–miniSOG, рассеивали в 96-луночный планшет и растили в присутствии ФМН в течение 24 ч. После этого к клеткам добавляли различные концентрации фуримазина и инкубировали при 37°C в атмосфере CO₂ в течение 48 ч. Цитотоксический эффект при максимальной концентрации фуримазина составил 48% (рис. 3Б).

Известно, что miniSOG в митохондриальной или примембранной локализации вызывает гибель почти 100% клеток HeLaKyoto при облучении синим светом (55 мВт/см²) [28]. Кроме того, ненасыщенные жирные кислоты, содержащиеся в большом количестве в плазматической мембране, являются главной мишенью активных форм кислорода [29]. Дополнительным фактором, вносящим вклад в фотоиндуцированное повреждение липидов, является молекулярный кислород, хорошо растворимый в липидах. Таким образом, в липидном окружении фотосенсибилизатор имеет больше шансов встретиться с молекулярным кислородом и выработать АФК, чем в водном.

Принимая во внимание данные работ [28, 29], мы полагаем, что цитотоксический эффект, выявленный нами в ходе работы, вероятно, можно усилить, используя гибридные конструкции NanoLuc–miniSOG с сигналами различной внутриклеточной локализации (митохондриальной, примембранной, лизосомной). Системы, основанные на BRET-опосредованной активации фотосенсибилизатора, позволят существенно расширить возможности применения ФДТ, преодолев проблему «окна прозрачности» биологических тканей.

Нами доказана возможность возбуждения цитотоксического флавопротеида miniSOG светом, испускаемым окисленной формой субстрата люциферазы, показана возможность использования данной системы для фотоиндуцированной гибели клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые показана возможность использования биолюминесцентного резонансного переноса энергии для возбуждения генетически кодируемого фотосенсибилизатора. Испускаемый

окисленной формой люциферазного субстрата свет переводит фототоксичный белок miniSOG, входящий в состав гибрида с люциферазой, в возбужденное состояние, необходимое для генерации активных форм кислорода и индукции клеточной гибели. Использование биолюминесценции в качестве внутриклеточного источника излучения для возбужде-

ния фотосенсибилизатора в раковой клетке может стать решением проблемы доставки света вглубь тканей и расширить возможности фотодинамической терапии опухолей глубоких тканей и метастазов. ●

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 16-14-10321).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ackroyd R., Kelyt C., Brown N., Reed M. // Photochem. Photobiol. 2001. V. 74. № 5. P. 656–669.
- Raab O. // Zeitung Biol. 1900. V. 39. P. 524–526.
- Schweitzer V.G. // Otolaryngol. Head Neck Surg. 1990. V. 103. № 6. P. 981–985.
- Hayata Y., Kato H., Konaka C., Ono J., Takizawa N. // Chest. 1982. V. 81. № 3. P. 269–277.
- Hayata Y., Kato H., Okitsu H., Kawaguchi M., Konaka C. // Semin. Surg. Oncol. 1985. V. 1. № 1. P. 1–11.
- Ward B.G., Forbes I.J., Cowled P.A., McEvoy M.M., Cox L.W. // Am. J. Obstet Gynecol. 1982. V. 142. № 3. P. 356–357.
- Plaetzer K., Krammer B., Berlanda J., Berr F., Kiesslich T. // Lasers Med. Sci. 2009. V. 24. № 2. P. 259–268.
- Grebenik E.A., Deyev S.M. // Russ. Chem. Rev. 2016. V. 85. № 12. DOI: 10.1070/RCR4663
- Pfleger K.D., Eidne K.A. // Nat. Methods. 2006. V. 3. № 3. P. 165–174.
- Baumes J.M., Gassensmith J.J., Giblin J., Lee J.J., White A.G., Culligan W.J., Leevy W.M., Kuno M., Smith B.D. // Nat. Chem. 2010. V. 2. № 12. P. 1025–1030.
- Takai A., Nakano M., Saito K., Haruno R., Watanabe T.M., Ohyanagi T., Jin T., Okada Y., Nagai T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. № 14. P. 4352–4356.
- Iyer M., Wu L., Carey M., Wang Y., Smallwood A., Gambhir S.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. № 25. P. 14595–14600.
- Sieger S., Jiang S., Kleinschmidt J., Eskerski H., Schönsiegel F., Altmann A., Mier W., Haberkorn U. // Cancer Gene Ther. 2004. V. 11. № 1. P. 41–51.
- Adams J.Y., Johnson M., Sato M., Berger F., Gambhir S.S., Carey M., Iruela-Arispe M.L., Wu L. // Nat. Med. 2002. V. 8. № 8. P. 891–897.
- Hildebrandt I.J., Iyer M., Wagner E., Gambhir S.S. // Gene Ther. 2003. V. 10. № 9. P. 758–764.
- Carpenter S., Fehr M.J., Kraus G.A., Petrich J.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. № 25. P. 12273–12277.
- Theodossiou T., Hothersall J.S., Woods E.A., Okkenhaug K., Jacobson J., MacRobert A.J. // Cancer Res. 2003. V. 63. № 8. P. 1818–1821.
- Yuan H., Chong H., Wang B., Zhu C., Liu L., Yang Q., Lv F., Wang S. // J. Am. Chem. Soc. 2012. V. 134. № 32. P. 13184–13187.
- Kim Y.R., Kim S., Choi J.W., Choi S.Y., Lee S.H., Kim H., Hahn S.K., Koh G.Y., Yun S.H. // Theranostics. 2015. V. 5. № 8. P. 805–817.
- Mironova K.E., Proshkina G.M., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Lukyanov S.A., Petrov R.V., Deyev S.M. // Theranostics. 2013. V. 3. № 11. P. 831–840.
- Прошкина Г.М., Миронова К.Е., Деев С.М., Петров П.В. // ДАН. 2015. Т. 460. № 2. С. 228–231.
- Proshkina G.M., Shilova O.N., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. // Biochimie. 2015. V. 118. P. 116–122.
- Шилова О.Н., Прошкина Г.М., Рябова А.В., Деев С.М. // Вестн. Моск. университета. Серия 16: Биология. 2016. Т. 71. № 1. С. 17–22.
- Shu X., Lev-Ram V., Deerinck T.J., Qi Y., Ramko E.B., Davidson M.W., Jin Y., Ellisman M.H., Tsien R.Y. // PLoS Biol. 2011. V. 9. № 4. e1001041.
- Mosmann T. // J. Immunol. Methods. 1983. V. 65. № 1–2. P. 55–63.
- Carpenter S., Fehr M.J., Kraus G.A., Petrich J.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. № 25. P. 12273–12277.
- Hall M.P., Unch J., Binkowski B.F., Valley M.P., Butler B.L., Wood M.G., Otto P., Zimmerman K., Vidugiris G., Machleidt T., et al. // ACS Chem. Biol. 2012. V. 7. № 11. P. 1848–1857.
- Ryumina A.P., Serebrovskaya E.O., Shirmanova M.V., Snopova L.B., Kuznetsova M.M., Turchin I.V., Ignatova N.I., Klementieva N.V., Fradkov A.F., Shakhov B.E., et al. // Biochim. Biophys. Acta. 2013. V. 1830. № 11. P. 5059–5067.
- Girotti A.W. // J. Photochem. Photobiol. 2001. V. 63. № 1–3. P. 103–113.